

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

DE 04/02161

REC'D 07 JAN 2005

WIPO PGT

**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung
einer Patentanmeldung**

Aktenzeichen: 103 45 021:1

Anmeldetag: 23. September 2003

Anmelder/Inhaber: Universität Potsdam,
14469 Potsdam/DE

Bezeichnung: Verfahren zur nichtinvasiven Früherkennung von
Dickdarmkrebs und/oder Darmkrebsvorläuferzellen

IPC: C 07 H 21/00

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 28. Oktober 2004
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

Schäfer

**PRIORITY
DOCUMENT**
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

Verfahren zur nichtinvasiven Früherkennung von Dickdarmkrebs
und/oder Darmkrebsvorläuferzellen

5

Beschreibung

10 Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur nichtinvasiven
Früherkennung von Dickdarmkrebs und/oder Dickdarmkrebs-
vorläuferzellen, sie betrifft weiterhin Primer, mit denen
Mutationsanalysen in ausgewählten Regionen der Gene APC, K-
ras und β -Catenin durchgeführt werden können, sowie einen
15 Kit, der diese Primer umfasst und außerdem die Verwendung der
Primer und des Kits zur Mutationsanalyse, insbesondere zur
Früherkennung von Dickdarmkrebs und/oder Dickdarmkrebs-
vorläuferzellen.

20 Im Stand der Technik sind verschiedene Verfahren bekannt, um
Dickdarmkrebs zu detektieren. Die gängigsten in der Medizin
angewandten Verfahren zur Diagnose von Dickdarmkrebs sind der
Haemokkulttest, die Sigmoidoskopie und die Kolonoskopie.

25 Der Haemokkulttest, der auf dem Nachweis von Blut im Stuhl
beruht, ist aufgrund vielfältiger möglicher Ursachen von
Darmblutungen nicht ausreichend spezifisch für die Diagnose
von Dickdarmkrebs. Außerdem ist der Blutverlust aus kleinen
kolorektalen Tumoren (< 2 cm) mit 1 bis 2 ml pro Tag so
30 gering, dass er mit diesem Test nicht immer erfasst wird. Die
Sigmoidoskopie, eine Spiegelung des Enddarms, kann Tumore des
proximalen Kolons nicht erkennen. Geschätzt wird, dass 25 bis
34 % der Kolonkarzinome mit dieser Methode übersehen werden.

Die Kolonoskopie, bei der der gesamte Dickdarm gespiegelt wird, erkennt etwa 80 % der Tumore einer Größe von ≥ 1 cm, ist jedoch ein invasives Verfahren und aufgrund der daraus resultierenden geringen Akzeptanz bei den Patienten als regelmäßige Vorsorgeuntersuchung kaum geeignet. Derzeit arbeiten daher mehrere Arbeitsgruppen an der Entwicklung von Verfahren zur Diagnose von Darmkrebs in Stuhlproben.

Der Nachweis des carcinoembryonalen Antigens (CEA) in Fäces (US Pat. No. 005741650 A) ist kein zuverlässiger Test zur Vorhersage eines beginnenden Dickdarmtumors, sondern er ist vielmehr als Indikator für das Auftreten von Rezidiven geeignet. Ahlquist und Shuber konnten mit der auf der Polymerasekettenreaktion (PCR) basierenden Methode eine Übereinstimmung von K-ras-Mutationen in Stuhl- und Gewebeproben von Patienten mit Krebs oder großen Adenomen nachweisen. K-ras-Mutationen treten allerdings in weniger als 50 % aller Kolontumore auf und sind auch in nicht neoplastischem Gewebe zu finden, weshalb dieser Marker allein nicht ausreichend für ein Nachweisverfahren zur Früherkennung von Darmkrebs ist. Die gleiche Arbeitsgruppe hat einen Test entwickelt, der 15 definierte Punktmutationen in den Genen für K-ras, APC, p53 sowie Bat-26 detektiert und „long“ DNA in Stuhlproben nachweist. Dieser Test soll derzeit präklinischen Studien unterzogen werden. Aufgrund der großen Anzahl der in diesem Test untersuchten Mutationsstellen sind die zu erwartende Sensitivität und Spezifität sehr hoch, jedoch handelt es sich hierbei auch um einen extrem kostenintensiven Test.

Aufgabe der Erfindung war es daher, ein Verfahren bereitzustellen, mit dem Dickdarmkrebs bzw. Dickdarmkrebsvor-

läuferzellen einfach, sicher und effektiv detektiert werden können.

Die Erfindung löst dieses Problem durch die Bereitstellung eines Verfahrens zur nichtinvasiven Früherkennung von Dickdarmkrebs und/oder Darmkrebsvorläuferzellen durch Mutationsanalyse der Gene für APC, K-ras und β -Catenin in einer Probe, wobei das Verfahren folgende Schritte umfasst:

- Entnahme einer Stuhl- und/oder Gewebeprobe,
- Homogenisieren der Probe,
- Gewinnung von DNA aus der Probe,
- Durchführung einer Amplifizierungsreaktion in den Genen für APC, K-ras und β -Catenin,

wobei für APC die Primer

s1 TTGCAGTTATGGTCAATACCC
 as1 GTGCTCTCAGTATAAACAGGATAAG
 s2 CCTCAAAGGCTGCCACTTG
 as2 CTGTGACACTGCTGGAACCTTCGC
 s3 AGCACCCCTAGAACCAAATCCAGCAG
 as3 TGGCATGGTTTGTCCAGGGC
 s4 ACAAACCATGCCACCAAGCAGA
 as4 GAGCACTCAGGCTGGATGAACAAG
 s5 TTCCAGATGCTGATACTTTA
 as5 CTGAATCATCTAATAGGTCC,

für K-ras die Primer

s CTGGTGGAGTATTTGATAGTG
 as TCTATTGTTGGATCATATTCG

und für β -Catenin die Primer

s CTGATTTGATGGAGTTGGAC
 as CTTGAGTGAAGGACTGAGAA

verwendet werden, wobei Amplifikationsprodukte entstehen und

- Durchführung einer Mutationsanalyse in den Amplifikationsprodukten.

Überraschenderweise ist es mit diesem Verfahren möglich, nichtinvasiv, billig und einfach und mit einer Ersparnis an Zeit, Material und Arbeitsstufen sowie mit einer Ersparnis an Kosten, schwer beschaffbarer Feinchemikalien sowie mit einer erhöhten Zuverlässigkeit und größeren Effektivität Dickdarmkrebs und/oder Dickdarmkrebsvorläuferzellen sehr früh zu erkennen. Das erfindungsgemäße Verfahren vermehrt weiterhin die technischen Möglichkeiten der Krebsdiagnostik und stellt somit eine weitere Möglichkeit zur Früherkennung von Dickdarmkrebs zur Verfügung.

- Die geringe Anzahl an Arbeitsstufen ermöglicht es vorteilhafterweise, das Verfahren gegebenenfalls zu automatisieren oder zu miniaturisieren.

Das erfindungsgemäße Verfahren vereint weiterhin die Vorteile der einfachen Probengewinnung und die Möglichkeit, entstehenden Dickdarmkrebs bzw. Dickdarmkrebsvorläuferzellen in einem frühen Stadium zu diagnostizieren. Da es sich um ein nichtinvasives Verfahren handelt, bei dem beispielsweise die Abgabe einer Stuhlprobe oder gegebenenfalls einer Gewebeprobe ausreichend ist, erreicht das Verfahren eine hohe Akzeptanz bei den Probanden, bei denen es sich beispielsweise um Menschen oder Tiere handeln kann. Daher kann das Verfahren für Routinetests, aber auch für Vorsorgeuntersuchungen Anwendung finden. Aufgrund der verwendeten Kombination der drei untersuchten Gene, APC, K-ras und β -Catenin, die so mit frühen Mutationsergebnissen während der Kolonkanzerogenese in Verbindung gebracht werden, kann eine höhere Sensitivität und Spezifität erreicht werden als bei den bekannten Tests, die

sich insbesondere nur auf die Mutation eines Proteins beschränken. Vorteilhafterweise ist das erfindungsgemäße Verfahren nicht auf einige wenige definierte Punktmutationen festgelegt, sondern mit dem Verfahren ist es möglich, innerhalb der Bereiche, in den bei den untersuchten Genen gehäuft Mutationen auftreten, gegebenenfalls auch bisher unbekannte Mutationen zu erfassen.

Da unterschiedliche Arten von Dickdarmkrebs unterschiedliche Wege bei der Kanzerogenese beschreiten, bestand eine Schwierigkeit für die Entwicklung eines diagnostischen Kits darin, geeignete Marker zu kombinieren, die möglichst umfassend alle Arten bzw. viele Arten von Kolonkarzinomen erfassen, wie beispielsweise auch spontane Kolonkarzinome mit und ohne Mikrosatelliten-Instabilität, die durch unterschiedlichste Stimuli ausgelöst werden können, wie zum Beispiel Ernährung, häufiger Alkohol- oder Tabakkonsum, Expositionen gegenüber physikalischen oder chemischen Einflüssen usw.

Die gewählte Kombination der drei genannten Gene in Kombination mit den beanspruchten Primern ermöglicht eine einfache, sichere und effektive Diagnose von Dickdarmkrebs.

Das erfindungsgemäße Verfahren kann beispielsweise so erfolgen, dass aus humanem Stuhl eine erbsengroße Portion des abgesetzten Stuhls entnommen und folgend in flüssigem Stickstoff schockgefroren wird. Weiterhin ist es selbstverständlich auch möglich, dass humanes Tumorgewebe oder deren Vorläufer wie beispielsweise aberrante Crypten, Adenome bzw. Adenokarzinome in der Biopsie z. B. im Verlauf der Koloskopie oder bei einer OP entnommen wurden. Anschließend können die Stuhlprobe bzw. die Gewebeprobe homogenisiert werden, wobei dies beispielsweise in

Puffersystemen mit den dem Fachmann bekannten Kits erfolgen kann. Anschließend werden die so homogenisierten Proben zentrifugiert, so dass aus dem Überstand des Probenhomogenats DNA isoliert werden kann. Gegebenenfalls ist es möglich, vor diesem Schritt der Isolierung der DNA eine Anreicherung dieser vorzunehmen. Dies kann beispielsweise so erfolgen, dass die Zielgene aus der Gesamt-DNA durch Hybridisierung sequenzspezifischer biotinylierter Oligonukleotide mit den Zielgenen APC, K-ras, β -Catenin und der Kopplung des Biotinrestes an Streptavidin und weiterhin der Separation über magnetische Partikel mittels dem Fachmann bekannter Kits gewonnen werden. Hierbei sind die Oligonukleotidsequenzen so zu wählen, dass sie mit Bereichen hybridisieren, die von den nachfolgend verwendeten Primern begrenzt werden oder dicht neben dem amplifizierten Abschnitt liegen. Weiterhin ist es möglich, eine Anreicherung vorzunehmen durch den Ausschluss von fragmentierter DNA mit einer Größe von < 200 bp, die charakteristisch für DNA aus apoptotischen Zellen ist. Hierdurch wird neoplastische „long“-DNA separiert. Anschließend kann beispielsweise eine andere Amplifikationsreaktion mit sequenzspezifischen Primern gegen ausgewählte Bereiche in den Genen APC, K-ras und β -Catenin durchgeführt werden. Hierbei sind für APC die Primerpaare so gewählt, dass sie eine Amplifizierung überlappender Frequenzen in Exon 15 innerhalb des bekannten Bereichs gehäuft auftretender Mutationen (mutational cluster region; MCR) ermöglichen. Für β -Catenin sind die Primer beiderseits der in Exon 3 lokalisierten MCR positioniert und für K-ras sind die Primer beiderseits der bekannten in Exon 1 lokalisierten, MCR positioniert. Alle Primer werden so gewählt, dass sie PCR-Produkte einer Größe von 180 bis 350 bp haben. Eingesetzt werden hierbei die folgenden Primersequenzen; jeweils in 5'→3'-Richtung:

K-ras

s CTGGTGGAGTATTTGATAGTG
as TCTATTGTTGGATCATATTCG

5

β-Catenin

s CTGATTTGATGGAGTTGGAC
as CTTGAGTGAAGGACTGAGAA

10 **APC**

s1 TTGCAGTTATGGTCAATACCC
as1 GTGCTCTCAGTATAAACAGGATAAG
s2 CCTCAAAAGGCTGCCACTTG
as2 CTGTGACACTGCTGGAAC TTTCGC
15 s3 AGCACCCCTAGAACCAAATCCAGCAG
as3 TGGCATGGTTTGTCCAGGGC
s4 ACAAACCATGCCACCAAGCAGA
as4 GAGCACTCAGGCTGGATGAACAAG
s5 TTCCAGATGCTGATACTTTA
20 as5 CTGAATCATCTAATAGGTCC

Im weiteren Verfahrensverlauf ist es bevorzugt möglich, dass die mit den Primern gewonnenen PCR-Produkte mittels eines Agarosegels untersucht werden. Die Reinigung der PCR-Produkte kann aber auch ohne die Kontrolle der PCR-Produkte in einem Agarosegel mit einem dem Fachmann bekannten Kit vorgenommen werden. Für die Mutationsanalyse der PCR-Produkte stehen dem Fachmann mehrere bekannte Verfahren zur Verfügung, wie beispielsweise die Elektrophoresetechnik, bevorzugt SSCP. Hierbei kann eine Detektion der Konformation der Einzelstränge der Proben im Vergleich zum Wildtypstandard vorgenommen werden. Gegebenenfalls kann es sinnvoll sein, eine DNA-Extraktion aus dem SSCP-Gel und eine Sequenzierung aus

der so extrahierten DNA oder der korrespondierenden PCR-Produkte vorzunehmen, um bestimmte Mutationen spezifisch zu detektieren.

- 5 Der so vorgenommene Nachweis von Mutationen, bei denen als Marker die Gene APC, K-ras, β -Catenin eingesetzt werden, ist vorteilhaft, weil auf diese Weise alle Typen von spontanen Kolonkarzinomen zu einem besonders frühen Zeitpunkt erfasst werden können, da in den Tumorstadien, den aberranten
10 Crypten und Adenomen, zu einem hohen Prozentsatz K-ras oder β -Catenin mutiert vorliegt, sowie in den Adenomen und frühen Adenokarzinomen entweder APC oder β -Catenin mutiert ist.

- Mit dem erfindungsgemäßen Verfahren lassen sich daher nicht
15 nur einige genau bekannte Mutationen erfassen, sondern es werden innerhalb derjenigen Genabschnitte, für die bekannt ist, dass dort besonders häufig Mutationen auftreten, alle gegebenenfalls auch unbekannte Punktmutationen detektiert. Dieses Verfahren ist beispielsweise den immunologischen
20 Nachweisen eines aufgrund einer Mutation trunkierten Proteins überlegen.

Die Erfindung betrifft auch Primersequenzen ausgewählt aus der Gruppe umfassend:

25

für APC die Primer

- | | |
|-----------------|-----------------------------|
| SEQ ID-Nr. 1 | TTGCAGTTATGGTCAATACCC, |
| SEQ ID-Nr. 2 | GTGCTCTCAGTATAAACAGGATAAG, |
| SEQ ID-Nr. 3 | CCTCAAAAGGCTGCCACTTG, |
| 30 SEQ ID-Nr. 4 | CTGTGACACTGCTGGAAGTTTCGC, |
| SEQ ID-Nr. 5 | AGCACCCCTAGAACCAAATCCAGCAG, |
| SEQ ID-Nr. 6 | TGGCATGGTTTGTCCAGGGC, |
| SEQ ID-Nr. 7 | ACAAACCATGCCACCAAGCAGA, |

SEQ ID-Nr. 8 GAGCACTCAGGCTGGATGAACAAG,
 SEQ ID-Nr. 9 TTCCAGATGCTGATACTTTA,
 SEQ ID-Nr. 10 CTGAATCATCTAATAGGTCC,
 SEQ ID-Nr. 11 CTGGTGGAGTATTTGATAGTG,
 5 SEQ ID-Nr. 12 TCTATTGTTGGATCATATTCG,
 SEQ ID-Nr. 13 CTGATTTGATGGAGTTGGAC,
 SEQ ID-Nr. 14 CTTGAGTGAAGGACTGAGAA,

wobei die Sequenz

10 s CTGGTGGAGTATTTGATAGTG,
 as TCTATTGTTGGATCATATTCG,
 für K-ras verwendet wird,
 die Sequenz

s CTGATTTGATGGAGTTGGAC
 15 as CTTGAGTGAAGGACTGAGAA

für β -Catenin verwendet wird und die Sequenzen

s1 TTGCAGTTATGGTCAATACCC
 as1 GTGCTCTCAGTATAAACAGGATAAG
 s2 CCTCAAAAGGCTGCCACTTG
 20 as2 CTGTGACACTGCTGGAACCTTCGC
 s3 AGCACCCCTAGAACCAATCCAGCAG
 as3 TGGCATGGTTTGTCCAGGGC
 s4 ACAAACCATGCCACCAAGCAGA
 as4 GAGCACTCAGGCTGGATGAACAAG
 25 s5 TTCCAGATGCTGATACTTTA
 as5 CTGAATCATCTAATAGGTCC,
 für APC verwendet werden.

Die Primer können mit Vorteil zur Diagnose von Dickdarmkrebs
 30 und/oder Dickdarmkrebsvorläuferzellen eingesetzt werden.

In dem Verfahren werden Primersequenzen verwendet, die zu den nachfolgend angegebenen Bereichen auf den Genen für APC, β -Catenin und k-ras ausreichend homolog sind, um durch die Polymerasekettenreaktion ein Amplifizierungsprodukt zu bilden:

Bezeichnung des Gens	GenBank (NIH, USA) Accession no	Primerposition
APC	NM 000038	s1: 3020-3040 as1: 3283-3259
		s2: 3765-3784 as2: 4022-4000
		s3: 4021-4045 as3: 4334-4315
		s4: 4322-4343 as4: 4563-4540
		s5: 4483-4502 as5: 4740-4721
β -Catenin	NM 001904	s: 228-247 as: 443-424
k-ras	L 00045	s: 4-24 as: 205-185

Die Erfindung betrifft auch einen Kit, der die Primer umfasst, sowie die Verwendung des Kits zur nichtinvasiven Früherkennung von Dickdarmkrebs und/oder Darmkrebsvorläuferzellen. Der Kit kann gegebenenfalls Informationen zum

5 Kombinieren der Inhalte des Kits umfassen. Der Kit kann auch weitere chemische Reagenzien umfassen, die zur Detektion von Dickdarmkrebs erforderlich sind. Der Kit kann weiterhin Hilfs- oder Trägerstoffe, Enzyme, Markersubstanzen, aber auch Aufbewahrungsbehältnisse, Objektträger, optische Instrumente

10 oder andere Vorrichtungsteile umfassen, die eine biologische, chemische und oder physikalische Bestimmung von Dickdarmkrebs bzw. Dickdarmkrebsvorläuferzellen ermöglichen bzw. unterstützen.

15 Im Folgenden soll die Erfindung anhand eines Beispielen näher erläutert werden, ohne auf dieses Beispiel beschränkt zu sein.

Beispiel:

20 a) Entnahme der Stuhlprobe oder Gewebeprobe

Humaner Stuhl: Entnahme einer erbsengroßen Portion des abgesetzten Stuhls mit Entnahmeföfel, Überföhrung in ein kommerzielles Stuhlröhrchen, schockgefrieren in flüssigem Stickstoff, Lagerung bei -80 °C,

25 Nagerstuhl: Ausstrichen eines Stöcks geformten Stuhls aus dem Enddarm, schockgefrieren in flüssigem Stickstoff, Lagerung bei -80°C,

Humanes Tumorgewebe oder Vorläufer (aberrante Crypten, Adenome, Adenokarzinome). Biopsie im Verlauf der

30 Koloskopie oder OP;

b) Homogenisierung der Stuhlprobe in Puffersystemen aus kommerziellen Kits oder in TE-Puffer (z.B. 10 mM Tris-HCL,

pH 8.0, 1 mM EDTA) evtl. unter Einsatz von bis zu 400 mg/ml Proteinase K. Mixen des Homogenats bei 99 °C für 10 bis 30 Minuten, bevorzugt 15 Minuten; alternativ bei 55 °C für 30 bis 60 Minuten oder bei 37 °C für 30 bis 60 Minuten; Zentrifugation bei 12000 g für 5 Minuten.

c) Isolierung von DNA aus Überstand des Stuhlprobenhomogenats oder aus Gewebeproben mittels kommerzieller Kits;

d) (optional:) Gegebenenfalls Anreicherung

a. der Zielgene aus Gesamt-DNA durch Hybridisierung sequenzspezifischer biotinylierter Oligonukleotide mit den Zielgenen APC, K-ras und β -Catenin, Kopplung des Biotinrestes an Streptavidin und Separation über magnetische Partikel mittels kommerzieller Kits. Die Oligonukleotidsequenzen sind so zu wählen, dass sie mit Bereichen hybridisieren, die von den nachfolgend verwendeten PCR-Primern begrenzt werden oder dicht neben dem amplifizierten Abschnitt

oder

b. der neoplastischen „long“-DNA durch Ausschluss von fragmentierter DNA einer Größe von < 200 bp, die charakteristisch ist für DNA aus apoptischen Zellen

e) PCR mit sequenzspezifischen Primern gegen ausgewählte Bereiche in den Genen für APC, K-ras und β -Catenin:

APC: Primerpaare ermöglichen Amplifizierung überlappender Sequenzen in Exon 15 innerhalb des bekannten Bereichs gehäuft auftretender Mutationen (mutational cluster region; MCR),

β -Catenin: Primer beiderseits der in Exon 3 lokalisierten MCR,

K-ras: Primer beiderseits der bekannten, in Exon 1 lokalisierten, MCR positioniert..

5 Alle Primer werden so gewählt, dass die PCR-Produkte eine Größe von 180 bis 350 bp haben.

f) Kontrolle der PCR-Produkte auf 2 bis 3%igem Agarosegel, bevorzugt 2,5 % Agarose; gegebenenfalls Detektion von
10 Deletionen oder Insertionen;

g) Reinigung der PCR-Produkte mit kommerziellem Kit

h) Mutationsanalyse der PCR-Produkte mittels geeigneter Elektrophoresetechnik, bevorzugt SSCP: 5 bis 14%iges Acrylamidgel in 0,5 x oder 1 x TBE-Puffer, bevorzugt 8 % Acrylamid in 1 x TBE, Elektrophorese bei 4 bis 10 °C, 300 mA, 2 bis 4 Stunden oder 4 °C, 100 mA, 16 Stunden

20 Herkömmliche Färbemethoden, bevorzugt Färbung mit Silbernitrat

Detektion der Konformation der Einzelstränge der Proben im Vergleich zum Wildtyp-Standard

i) (optional:) DNA-Extraktion aus dem SSCP-Gel und Sequenzierung der aus dem SSCP-Gel extrahierten DNA oder der
25 korrespondierenden PCR-Produkte

Patentansprüche

1. Verfahren zur nichtinvasiven Früherkennung von Dick-
darmkrebs und/oder Darmkrebsvorläuferzellen durch
5 Mutationsanalyse der Gene für APC, K-ras und β -Catenin
in einer Probe,

dadurch gekennzeichnet, dass
das Verfahren folgende Schritte umfasst:

- Entnahme einer Stuhl- und/oder Gewebeprobe,
- 10 - Homogenisieren der Probe,
- Gewinnung von DNA aus der Probe,
- Durchführung einer Amplifizierungsreaktion in den
Genen für APC, K-ras und β -Catenin,
wobei für APC die Primer

15 s1 TTGCAGTTATGGTCAATACCC
as1 GTGCTCTCAGTATAAACAGGATAAG
s2 CCTCAAAAGGCTGCCACTTG
as2 CTGTGACACTGCTGGAACTTCGC
s3 AGCACCCCTAGAACCAAATCCAGCAG
20 as3 TGGCATGGTTTGTCCAGGGC
s4 ACAAACCATGCCACCAAGCAGA
as4 GAGCACTCAGGCTGGATGAACAAG
s5 TTCCAGATGCTGATACTTTA
as5 CTGAATCATCTAATAGGTCC,

25 für K-ras die Primer

s CTGGTGGAGTATTTGATAGTG
as TCTATTGTTGGATCATATTCG

und für β -Catenin die Primer

30 s CTGATTTGATGGAGTTGGAC
as CTTGAGTGAAGGACTGAGAA

verwendet werden, wobei Amplifikations-Produkte
entstehen und.

- Durchführung einer Mutationsanalyse in den Amplifikations-Produkten.

2. Verfahren nach Anspruch 1,
dadurch gekennzeichnet, dass
APC-, K-ras- und β -Catenin-Gene aus einer Gesamt-DNA durch Hybridisierung sequenzspezifischer biotinylierter Oligonukleotide mit den Genen APC, K-ras und β -Catenin mittels Kopplung des Biotinrestes an Streptavidin und nachfolgender Trennung über magnetische Partikel angereichert werden.

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2,
dadurch gekennzeichnet, dass
die PCR-Produkte in einem Agarose-Gel vor der Reinigung für Kontrollzwecke aufgetrennt werden.

4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3,
dadurch gekennzeichnet, dass
die Mutationsanalyse der PCR-Produkte mittels Elektrophoresetechnik erfolgt, bevorzugt SSCP.

5. Verfahren nach dem vorhergehenden Anspruch,
dadurch gekennzeichnet, dass
detektierte mutagene Konformationen der Einzelstränge isoliert und gegebenenfalls sequenziert werden.

6. Primersequenzen ausgewählt aus der Gruppe umfassend:
für APC die Primer

s1	TTGCAGTTATGGTCAATACCC
as1	GTGCTCTCAGTATAAACAGGATAAG
s2	CCTCAAAAGGCTGCCACTTG
as2	CTGTGACACTGCTGGAACCTCGC

s3 AGCACCCCTAGAACCAAATCCAGCAG

as3 TGGCATGGTTTGTCCAGGGC

s4 ACAAACCATGCCACCAAGCAGA

as4 GAGCACTCAGGCTGGATGAACAAG

5 s5 TTCCAGATGCTGATACTTTA

as5 CTGAATCATCTAATAGGTCC,

für K-ras die Primer

s CTGGTGGAGTATTTGATAGTG

as TCTATTGTTGGATCATATTCG

10 und für β -Catenin die Primer

s CTGATTTGATGGAGTTGGAC

as CTTGAGTGAAGGACTGAGAA.

7. Verwendung der Primersequenzen nach Anspruch 6 zur
15 Mutationsanalyse, insbesondere zur Analyse der APC, K-ras und β -Catenin-Gene.

8. Kit, umfassend die Primer ausgewählt aus der Gruppe
umfassend:

20 für APC die Primer

s1 TTGCAGTTATGGTCAATACCC

as1 GTGCTCTCAGTATAAACAGGATAAG

s2 CCTCAAAAGGCTGCCACTTG

as2 CTGTGACACTGCTGGAACTTCGC

25 s3 AGCACCCCTAGAACCAAATCCAGCAG

as3 TGGCATGGTTTGTCCAGGGC

s4 ACAAACCATGCCACCAAGCAGA

as4 GAGCACTCAGGCTGGATGAACAAG

s5 TTCCAGATGCTGATACTTTA

30 as5 CTGAATCATCTAATAGGTCC,

für K-ras die Primer

s CTGGTGGAGTATTTGATAGTG

as TCTATTGTTGGATCATATTCG

und für β -Catenin die Primer

s CTGATTTGATGGAGTTGGAC

as CTTGAGTGAAGGACTGAGAA

und gegebenenfalls Informationen zum Kombinieren der
5 Inhalte des Kits.

9. Verwendung des Kits zur Detektion von Dickdarmkrebs
und/oder Dickdarmvorläuferkrebszellen.

Zusammenfassung

5 Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur nichtinvasiven Früherkennung von Dickdarmkrebs und/oder Dickdarmkrebsvorläuferzellen, Primer, mit denen Mutationsanalysen in ausgewählten Regionen der Gene APC, K-ras und β -Catenin durchgeführt werden können, sowie einen Kit, der diese Primer
10 umfasst und außerdem die Verwendung der Primer und des Kits zur Mutationsanalyse, insbesondere zur Früherkennung von Dickdarmkrebs und/oder Dickdarmkrebsvorläuferzellen.